

Helsinki 18.12.2003

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT

REC'D 13 FEB 2004

WIPO PCT



Hakija
Applicant

Valio Oy
Helsinki

Patenttihakemus nro
Patent application no

20021968

Tekemispäivä
Filing date

04.11.2002

Kansainvälinen luokka
International class

C12N

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä hiivojen kasvun estämiseksi"

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims and abstract originally filed with the Finnish Patent Office.

Eija Solja
Eija Solja
Apulaistarkastaja

Maksu 50
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001 Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500 Telefax: 09 6939 5328
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500 Telefax: + 358 9 6939 5328
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Menetelmä hiivojen kasvun estämiseksi

Keksinnön ala

Keksintö liittyy hiivojen kasvun estämiseen. Erityisesti kuvataan
5 tuotteita ja menetelmiä hiivojen kasvun estämiseksi ja hiivojen aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi ja hoitamiseksi.

Keksinnön tausta

Ihmisen ympäristössä ja elimistössä on jatkuvasti hiivoja. Terveellä-
10 kin ihmisellä kasvaa limakalvoilla ja koko ruoansulatuskanavan alueella *Candi-
da albicans*-hiiva (Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis
in the older people. *J Am Geriatr Soc* 1997;45:863-870). Myös suuontelo ja
hampaiden välikudokset ovat hyvä kasvualusta lukuisille mikrobilajeille, ja näis-
tä löytyykin mm. *Candida albicans* -lajia ja pienemmissä määrin *C. glabrata* - ja
15 *C. tropicalis* -hiivoja. Normaalisti hiivasolut ovat passiivisessa tilassa, eikä nii-
den kasvusta ole terveille ihmisille haittaa. Epäsuotuisissa olosuhteissa hiivat,
kuten *C. albicans*, alkavat muodostaa sienirihmoja ja tunkeutua rihmanmuo-
dostuksen kautta syvemmälle limakalvoihin. Näin syntyy paikallinen hiivainfek-
tio, suussa esim. suusammas, suutulehdus tai kielitulehdus.

20 Hiivainfektioiden synnyn edellytyksenä on yleensä vastustuskyvyn
heikkeneminen, johon voi olla syynä tiettyjen lääkkeiden, kuten laajakirjoisten
antibioottien, kortikosteroidien tai sytostaattien käyttö, diabetes, pahanlaatuiset
kasvaimet ja immuunihäiriöt. Suun mikro-organismit leviävät helposti veren-
kierron välityksellä muualle elimistöön, josta saattaa olla vakaviakin seurauk-
25 sia, kuten verenmyrkytys, sydämen sisäkalvon ja aivokalvon tulehdus, etenkin
henkilöille, joiden yleinen terveydentila on heikentynyt (Shay ym.1997).

Ihmisellä yleisin ja tärkein hiivainfektion aiheuttaja on *Candida albi-
cans* (Mäkelä ym.1988. Lääketieteellinen mikrobiologia 5. uusittu painos s.
270-271. Kustannus Oy Duodecim 1988). Terveen ihmisen ruoansulatuskana-
30 vasta *C. albicans* löytyy aika usein, suusta 30 - 50 prosentilta, terveeltä iholta
ja virtsateistä n. 1 prosentilta ihmisiltä. Myös muita *Candida*-sukuun kuuluvia
lajeja voidaan satunnaisesti löytää. Tärkeimpiä niistä ovat *C. tropicalis*, *C.
pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ja *C. guilliermondii*, jotka ovat ihmi-
sen opportunistisia patogeeneja, kuten *C. albicans* (Mäkelä ym. 1988).

Ikääntyvillä tyypillisesti esiintyvät lukuisat sairaudet ja niihin käytetyt lääkkeet saattavat heikentää immuniteettiä ja samalla hammasterveyttä (Pajukoski H, Meurman JH, Snellman-Gröhn S, Sulkava R. Oral health in hospitalized and nonhospitalized community-dwelling elderly patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:437-443). Myös huono suuhygienia altistaa vanhukset hiivainfektioille (Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Banon-Clement JM, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis* 1996;2:285-290). Ikääntyminen sinänsä lisää hiivan esiintyvyyttä ja määrää, mikä viittaa siihen, että elimistön hiivan kasvua estävä vaikutus heikkenee iän myötä (Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swalls-Wenger J, Enger L, Soil DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* 1999;78:857-868).

Helsinkiläisvanhuksista suun hiivan kasvua on löydetty 75 %:lla ja korkeita pitoisuuksia 33 %:lla (Närhi TO, Ainamo A, Meurman JH. Salivary yeasts, saliva, and oral mucosa in the elderly. *J Dent Res* 1993 ;72:1009-1014). *Candida*-hiivainfektio on löytynyt puolestaan 60 %:lta hiivan kantajista (Wilkieson C, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ ym. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 1991;20:13-16). *Candida albicans* -lajin jälkeen seuraavaksi yleisimmät hiivat ovat *C. glabrata* (29 %), *C. tropicalis* (13 %), *Saccharomyces cerevisiae* (11 %) ja *C. parapsilosis* (9 %) (Lockhart ym. 1999).

Eräs tärkeä hiivan kasvua suussa lisäävä tekijä on syljen erityksen väheneminen (Närhi ym. 1993). Ikääntymisen vaikutuksia selvittäneessä viisivuotisseurannassa havaittiin, että stimuloitu kokosyljen erityys vähenee, mutta puskurikapasiteetti nousee ikääntyessä (Närhi TO, Kurki N, Ainamo A. Saliva, salivary micro-organisms, and oral health in the home-dwelling old elderly - a five- year longitudinal study. *J Dent Res* 1999;78:1640-1646). Erityisesti runsas lääkkeiden käyttö ja endokrinologiset sairaudet vähentävät syljen eritystä (Pajukoski H, Meurman JH, Snellman-Gröhn S, Keinänen S, Sulkava R. Salivary flow and composition in elderly patients referred to an acute care geriatric ward. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84:265-71). Hiivan pitoisuudet olivat selkeästi korkeammat niillä, joiden syljen eritysnopeus ja puskurikapasiteetti olivat alentuneet (Närhi ym. 1993). Syljen eritysnopeus suomalaisvanhuksilla vaihtelee välillä 0,6 - 1,0 ml/mm (Pajukoski ym. 1997) ja

alentunutta erityistä (< 0,7 ml/mm) havaitaan peräti 55 %:lla ja alhainen puskurikapasiteetti 34 %:lla vanhuksista (Pajukoski ym. 1997).

Kandidoosia hoidetaan perinteisesti hiivalääkkeillä, kuten nystatiinilla, vaikeampia tapauksia flukonatsolilla tai itrakonatsolilla (Shay ym. 1997).

- 5 Myös suun hygienian tehostamisella on voitu vähentää pitkäaikaishoidossa olevien vanhusten suun limakalvojen kolonisoitumista *Candidalla* (Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:141-149). Myös klooriheksidiiniä ja ksylitolia
- 10 sisältävällä purukumilla voitiin hiivan määrää vähentää 22 % (Simons D, Kidd EAM, Beighton D, Jones B. The effect of chlorhexidine/xylitol chewing-gum on cariogenic salivary microflora: A clinical trial in elderly patients. *Caries Res* 1997;31:91-96).

- Tietyt ryhmät, kuten esimerkiksi pitkäaikaissairaat ja vanhukset,
- 15 ovat myös alttiita yleisinfektioille heikentyneen vastustuskyvyn, aliravitsemuksen ja kroonisten sairauksien takia. Myös suuhygienialla ja suun mikrobistolla on havaittu yhteys vanhusten alahengitysteiden infektioihin, kuten keuhko-kuumeeseen ja keuhkoputken tulehdukseen (ks. Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 1999;70:793-802). Infektio olet-
- 20 tettavasti syntyy, kun suun patogeenisiä mikrobeja joutuu aspiraation kautta hengitysteihin. Pitkäaikaishoitopotilailla yleisimmin esiintyviä infektioita ovat ylempien ja alemmien hengitysteiden infektiot (70 %), virtsatieinfektiot (12 %), gastroenteriitit ja ripuli (12 %) sekä iho- ja pehmytkudostulehdukset (6 %) (Orr PH, Nicolle LE, Duckworth H, Brunka J, Kennedy J, Murray D et al. Febrile uri-
- 25 nary infection in the institutionalized elderly. *Am J Med* 1996; 100:71-77). Hygieniainventiolla on pystytty vähentämään pitkäaikaissairaanhoidossa olevien vanhusten ylähengitysteiden infektioita 16 % (Makris AT, Morgan L, Gaber DJ, Richter A, Rubino JR. Effect of a comprehensive infection control program on the incidence of infections in long-term care facilities. *Am J Infect Control*
- 30 2000;28:3-7).

- Hiivan toinen pääasiallinen esiintyvyyalue on genitaalialue; varsinkin naisilla hiivainfektiot ovat tavallisia. Vaginiitti eli emätintulehdus on yleisin gynekologinen oire ja yksi tavallisimmista oireista, joiden takia potilas hakeutuu lääkärin vastaanotolle (Mäkelä ym. 1988). Vaginiitin tavallisin
- 35 aiheuttaja on bakteeri, toiseksi yleisin aiheuttaja on hiivasieni. Useimmin

tavataan joko *C. albicans* - tai *C. glabrata* -lajia. *Candida albicans* -hiiva kuuluu emättimen normaaliin flooraan, mutta ei tavallisesti aiheuta tulehdusta. Normaalisti emättimen bakteerifloora rajoittaa hiivan kasvua, mutta tietyissä oloissa hiivan kasvu riistyy hallinnasta. Hiivatulehduksen riskitekijät ovat

5 antibioottien käyttö (erityisesti laajaspektriset antibiootit), raskaus, sokeritauti, immuunivajaus aiheuttavat sairaudet ja kortikosteroidien käyttö. Hiivasieni todetaan 10 - 20 % gynekologisen poliklinikan potilaista, mutta vain osalla hiivasieni aiheuttaa klinisen vulvovaginiitin. Emäksinen pH suosii hiivan kasvua. Hiivan virulenssikyky riippuu hiivan pitoisuudesta, itiörihmojen

10 muodostuskyvystä (invasiivisuus), steroidireseptoreista ja kyvystä muodostaa esim. proteaaseja. Tutkimuksissa on havaittu sienirihmojen pystyvän tunkeutumaan emättimen epiteeliin (Mäkelä ym. 1988).

Maitohappobakteereita on käytetty vaihtelevin tuloksin emätintulehdusten ehkäisyyn. Jogurtin nauttiminen 6 kk vähensi *Candidan* kolonisaatiota

15 sekä emätintulehdusten lukumäärää (Hilton ym. 1992. Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for Candidal vaginitis. *Ann Intern Med* 1992;116:353-357). Sen sijaan Shalevin työryhmän (1996) tutkimuksessa *Lactobacillus acidophilus* -jogurtti vähensi bakteerien aiheuttamia emätintulehduksia, mutta ei *Candida*-hiivan aiheuttamia verrattuna pastöroit

20 tuun jogurttiin (Shalev ym. 1996. Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yoghurt as prophylaxis for recurrent Candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch Fam Med* 1996;5:593-596; Sieber R, Dietz U-T. *Lactobacillus acidophilus* and yogurt in the prevention and therapy of bacterial vaginosis. *Int Dairy J* 1998; 8:599-607; ks. myös Redondo-

25 Lopez ym. 1990. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 1990;12:856-872).

Hiivasieni aiheuttaa myös virtsatiehyetulehdusta (uretriitti).

Ruoansulatuskanavassa esiintyy useiden tutkimusten mukaan *C. albicansia* 20 - 40 % ihmisistä (Lennette ym. 1985. Manual of clinical microbiology, 4. painos. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985).

30 Ruoansulatuskanavassa hiivan ylikasvu ilmenee yleensä ripulina.

Hiivaoireyhtymästä eli hiivasyndroomasta puhuttaessa tarkoitetaan yleensä maha-suolikanavassa lisääntyntä *Candida albicans* -hiivakasvua, jonka ajatellaan estävän immuunijärjestelmän toimintaa ja aiheuttavan erilaisia

35 oireyhtymiä. Hiivan liikakasvuun on liitetty joukko systeemioireita, kuten kes-

kushermosto-oireita, kiputiloja, väsymystä ja suolisto-oireita. Oletetaan, että oireet johtuvat hiivojen erittämistä toksineista. Tieteellistä näyttöä oireiden ja hiivan välisestä yhteydestä ei kuitenkaan ole. Hiivasyndroomaa hoidetaan niukka-
 5 happamia ja/tai runsaasti kuitua sisältäviä ruoka-aineita. Hapatetut ruoat ja erityisesti hapantointivalmisteet kuuluvat tärkeänä osana ruokavaliohoitoon. Maitohappobakteereja käytetäänkin usein tasapainottamaan häiriintynyttä suolistoflooraa.

Hiiva aiheuttaa siis monenlaisia sairauksia, sekä välittömästi että
 10 välillisesti. Siten on jatkuva tarve löytää uusia keinoja hiivan kasvun ja toiminnan estämiseen, hiivan aiheuttamien tautien ennaltaehkäisyyn ja hoitamiseen sekä hiivan aiheuttaminen oireiden lievittämiseen.

Lääkehoidon vaihtoehdoksi tai sen lisäksi on nykyään pyritty hyödyntämään muitakin tapoja hoitaa terveyttä. Eräs uusimpia keinoja on terveys-
 15 vaikutteisten ravintoaineiden tai luontaistuotteiden käyttäminen, mikä onkin kuluttajien keskuudessa tervetullut vaihtoehto. Sellaiset terveysvaikutteiset tuotteet, joilla on hiivojen kasvua ja toimintaa estäviä vaikutuksia, olisivat siten erittäin tervetullut lisä kaupan valikoimiin. Edullisesti tuotteiden tulisi olla kuluttajille miellyttäviä ja tutunomaisia ja siten helppo käyttää esimerkiksi osana normaalia ruokavaliota.
 20

Probioottien vaikutusta antimikrobisina aineina on kuvattu alan kirjallisuudessa. Maitohappobakteereilla on kyky tuottaa antimikrobisia yhdisteitä, orgaanisia happoja, maitohappoa, rasvahappoja, vetyperoksidia, diasetyyliä, hiilidioksidia sekä bakteriosiineja ja siten ehkäistä patogeenisten mikrobien
 25 kasvua (McGroarty JA. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6:251-264). Eräät *Lactobacillus acidophilus* -kannat estivät *Candidan* kasvua *in vitro* tuottamalla vetyperoksidia (Jack M, Wood JB, Berry DR. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbios* 1990;62:37-46; Fitzsimmons N, Berry DR. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios* 1994;80:125-133). Myös *Lactobacillus rhamnosus* LGG:n, ATCC 53103, on havaittu tuottavan antimikrobista yhdistettä, mahdollisesti lyhytketjuista rasvahappoa, joka estää mm. *Escherichia colin*, *Pseudomonaksen*, *Salmonellan*, *Streptococcusin*, *Bacilluksen*, *Clostridiumin* ja *Bifidobacte-*
 30
 35

riumin kasvua *in vitro* -olosuhteissa (Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents Chemother* 1987;31:1231-1233).

- Maitohappobakteerit saattavat myös estää muiden mikrobien adhe-
- 5 soitumista epiteelisoluihin. Mm. eräät *Lactobacillus acidophilus* ja *L. casei* -kannat estivät *C. albicansin* adheesiota 22 - 46 % uroepiteelisoluihin *in vitro* -olosuhteissa (Reid G, Tieszer C, Lam D. Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *J Indust Microbiol* 1995;15:248-253). Eläinkokeissa *Lactobacillus rham-*
- 10 *nosus* LGG:n on todettu vähentävän *C. albicansin* määrää hiirten ruoansulatuskanavassa sekä suun alueen kandidoosia stimuloimalla soluvälitteistä immuunivastetta *C. albicansin* vasta-aineille. (Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L et al. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997;65:4165-
- 15 4172; Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Hilty M, Balish E. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to *Candida albicans* -colonized immunodeficient mice. *J Food Protect* 2000;63 :638-644).

- Lactobacillus* LC 705:n ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp.
- 20 *shermanii* PJS:n on yhdessä havaittu estävän hiivojen kasvua jogurtissa ja maitorahkassa (Suomalainen T, Mäyrä-Mäkinen A. Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait* 1999;79:165-174).

- Maitohappobakteerit ja niiden solurakenteet voivat aktivoida elimistön puolustuskykyä lisäämällä makrofagien ja luonnollisten tappajasolujen aktiivisuutta, T- ja B-solujen määrää sekä vasta-aineiden pitoisuutta (Perdigon G,
- 25 Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. Symposium: Probiotic bacteria for humans: Clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995;78:1597-1606).

- Myös *Lactobacillus rhamnosus* LGG:n on havaittu vahvistavan suoliston normaalia puolustuskykyä haitallisia bakteereita, viruksia ja hiivoja vastaan (Kaila M, Isolauri E, Soppi E ym. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-144; Wagner ym. 1997). Eläinkokeissa *Lactobacillus* GG on myös lisännyt syljen sekretorisen IgA:n pitoisuutta (Negretti F,
- 35 Casetta P, Clerici-Bagozzi D, Marini A. Researches on the intestinal and sys-

temic immunoresponses after oral treatments with *Lactobacillus* GG in rabbit. *Physiopath Clin* 1997;7:15-21). Limakalvojen sekreetorisen IgA:n tiedetään suo-
 jaavan hengitysteitä, ruoansulatuskanavaa ja urogenitaalielimiä infektioilta
 (Nagura H. Mucosal defence mechanism and secretory IgA system. *Bifidobac-*
 5 *teria Microflora* 1990;9: 17-25). Täten maitohappobakteerit saattavat vähentää
 myös hengitystie- ja ruoansulatuskanavan infektioita, mistä onkin saatu viitteitä
 päiväkotilapsilla tehdyssä tutkimuksessa (Hatakka K, Savilahti F, Pönkä A,
 Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. The effect of long-term
 10 consumption of a probiotic milk on the infections of children attending day care
 centres: a double-blind randomised trail. Submitted to BMJ in May, 2000).

Keksinnön lyhyt kuvaus

Esillä olevan keksinnön tavoitteena on aikaansaada keino, jonka
 avulla hiivan kasvua ja toimintaa ihmisessä ja eläimissä voidaan estää tai vä-
 15 hentää. Tavoite saavutetaan keksinnön mukaisella tuotteella, käytöllä ja mene-
 telmällä, joille on tunnusomaista se, mitä sanotaan itsenäisissä patenttivaati-
 muksissa. Keksinnön edulliset suoritusmuodot ovat epäitsenäisten patenttivaati-
 musten kohteena.

Esillä oleva keksintö perustuu tiettyjen probioottien käyttöön hiivan
 20 kasvun ja toiminnan estämiseksi, hiivan aiheuttamien tautien ennaltaehkäise-
 miseksi ja hoitamiseksi sekä hiivan aiheuttamien oireiden lievittämiseksi ihmisessä
 ja eläimissä.

Keksintö koskee siten mikrobien *Lactobacillus rhamnosus* LGG,
 ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium*
 25 *freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttöä hiivan estoon ihmisillä ja
 eläimillä.

Keksinnön tarkoitusta varten bakteereja voidaan nauttia erikseen tai
 yhdistelmänä. Niitä voidaan nauttia sellaisenaan, esimerkiksi lyofilisoidun val-
 misteen muodossa, tai käyttää syötäväksi tarkoitettujen tuotteiden, kuten mai-
 30 totuotteiden tai juomien, lisänä tai ainesosana. Yhdistelmän muodostamiseksi
 voidaan käyttää bakteerien sekaviljelmää tai jokaisen puhdasviljelmää. Yhdis-
 telmästä voidaan myös valmistaa yksikköannosmuoto, kuten kapseli. Kapseli
 voi sisältää kaikkia edellä mainittuja bakteereita, edullisesti lyofilisoituina viljel-
 minä, tai sarjaan voi kuulua kolme kapselia, yksi kutakin bakteeria varten.

Keksintö koskee siten myös bakteerien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttöä valmistettaessa hiivan estoon tarkoitettua tuotetta.

- 5 Tuote voi olla esimerkiksi elintarviketeollisuuden tai lääketeollisuuden tuote, terveysvaikutteinen tuote tai luontaistuote. Edullisina tuotteina esitetään terveysvaikutteisia meijeriteollisuuden tuotteita, kuten juustoa, johon mikrobit on lisätty tuotteen valmistuksen yhteydessä. Mikrobit voivat toimia myös hapatteena ja juuston tai muun tuotteen rakenteen muokkaajina. Toisena edullisena tuoteryhmänä esitetään farmaseuttiset valmisteet, etenkin tabletit ja kapselit, jotka edellä mainittujen mikro-organismien lisäksi sisältävät tällaisissa tuotteissa tavanomaisia apu- ja lisäaineita, sekä mahdollisesti myös muita aktiivi-aineita. Erityisen edullisina tuotteina esitetään suun kautta otettavat valmisteet, kuten tabletit ja kapselit, jotka LGG:n, LC705:n ja PJS:n lisäksi sisältävät ksylitolia. Keksinnön mukaisesti käytettävien mikrobien lisäksi tuotteet
- 10
- 15 voivat sisältää myös muita mikrobeja.

Tässä esitetyt bakteerit, yhdistelmät ja muut tuotteet vaikuttavat ihmisen elimistössä olevan hiivan kasvuun ja toimintaan, ja ennaltaehkäisevät hiivatartuntoja. Ne ovat siten käyttökelpoisia hiivan aiheuttaminen vaivojen ja tautien ennalta ehkäisyyn ja hoitoon, oireiden lievittämiseen sekä yleisen terveydentilan parantamiseen.

20

Keksintö koskee myös menetelmää hiivojen kasvun estämiseksi ja hiivojen aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi tai hoitamiseksi tai oireiden lievittämiseksi eläimessä tai ihmisessä, joka menetelmä käsittää mikrobien

25 *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, antamisen niitä tarvitsevalle yksilölle riittävä määrä halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi.

30 Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Esillä oleva keksintö perustuu siis tiettyjen probioottien käyttöön hiivojen kasvun ja toiminnan estämiseen ihmisen tai eläimen elimistössä.

Probiootit ovat eläviä mikrobeja, jotka ihmiselle tai eläimelle annettuna edistävät isännän terveyttä parantamalla suoliston mikrobitasapainoa, tämän

35 kautta tai lisäksi probiooteilla voi olla paljon muitakin hyödyllisiä ominaisuuksia.

Tärkeimmät probiootit ovat maitohappobakteerit, propionihappobakteerit ja bifidobakteerit. Niitä esiintyy luonnostaan ihmisen ja eläinten elimistössä. Lakto-
 basillit kuuluvat tärkeänä osana ihmisen elimistön normaalia bakteeriflooraa
 (Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the
 5 control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis*
 1990;12:856-872). Propionihappobakteereja löytyy puolestaan iholta ja ruoan-
 sulatuskanavasta (MacFarlane GT, Allison C, Gibson SAW, Cummings JH.
 Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J Appl*
Bacteriol 1988;64:37-46). Turvallisuutensa ja terveysvaikutteisuutensa takia
 10 probiootteja käytetään paljon myös elintarvikkeissa.

Keksinnön mukaisesti käytettävät kannat *Lactobacillus rhamnosus*
 LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja
Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, on kuvattu tek-
 niikan tasossa.

15 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on kuvattu mm. US-patentissa
 5,032,399, Gorbach & Goldin. Kanta on eristetty ihmisen ulosteesta, se pystyy
 kasvamaan hyvin pH:ssa 3 ja kestää elävänä alhaisemmissakin pH-arvoissa
 sekä korkeissa sappihappopitoisuuksissa. Kannan adhesiivisyys on erinomainen
 sekä mukos- että epiteelisoluihin. Maitohapon tuotto glukoosista on hyvä, MRS-
 20 liemessä kasvatettuna kanta tuottaa maitohappoa 1,5 – 2 %. Kanta ei fermentoi
 laktoosia. Kanta käyttää seuraavia hiilihydraatteja: D-arabinoosi, riboosi, galak-
 toosi, D-glukoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, ramnoosi, dulsitoli, inositoli, mannitoli,
 sorbitoli, N-asetyyliglukoosiemiini, amygdaliini, arbutiini, eskuliini, salisiini, sellu-
 bioosi, maltoosi, sakkaroosi (hitaasti), trehaloosi, melitsitoosi, gentibioosi, D-taga-
 25 toosi, L-fukoosi, ja glukonaatti. Kanta kasvaa hyvin +15 °C - 45 °C lämpötiloissa,
 optimin ollessa 30 - 37 °C. *Lactobacillus rhamnosus* GG on talletettu talletus-
 laitokseen the American Type Culture Collection talletusnumerolla ATCC 53103.

Lactobacillus rhamnosus GG on ihmiselle luonnollinen bakteeri-
 kanta, jonka probioottisia vaikutuksia on tutkittu erittäin paljon (Saxelin M.
 30 *Lactobacillus* GG - a human probiotic strain with thorough clinical docu-
 mentation. *Food Rev Int* 1997;13:293-313). Se pysyy elinkykyisenä ruoan-
 sulatuskanavassa ja pystyy väliaikaisesti kolonisoimaan suolistoa (Goldin BR,
 Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of
Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci*
 35 1992;37:121-128). LGG näyttää myös kykenevän kolonisoimaan suuonteloa

ainakin väliaikaisesti, sillä bakteeria löytyi koehenkilöiden syljestä vielä 2 viikon ajan, kun 7 päivää kestänyt LGG-jogurtin nauttiminen oli lopetettu (Meurman JH, Antila H, Salminen S. Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microbiol Ecol Health Dis* 1994;7:295-298). LGG:tä on nykyisin useissa kaupallisissa hapanmaito- ja mehuvalmisteissa (Gefilus®).

Lactobacillus casei ssp. *rhannosus* LC705 on tarkemmin kuvattu FI-patentissa 92498, Valio Oy. LC705 on gram-positiivinen, lyhyt, ketjuuntuva sauva, se on homofermentatiivinen, heikosti proteolyttinen, kasvaa hyvin 15 - 45 °C:ssa, ei muodosta ammoniakkia arginiinista, on katalaasi-negatiivinen, tuottaa MRS-liemessä (LAB M) kasvaessaan maitohappoa (1,6 %), joka on optiselta aktiivisuudeltaan L(+)-muotoa, hajottaa sitraattia (0,169 %) muodostaen diasetyyliä ja asetoinia, ja fermentoi ainakin seuraavia hiilihydraatteja (sokereita, sokerialkoholeja): riboosi, galaktoosi, D-glukoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, L-sorboosi, ramnoosi, mannitoli, sorbitoli, metyyli-D-glukosidi, N-asetyyli-glukosamiini, amygdaliini, arbutiini, eskuliini, salisiini, sellobioosi, maltoosi, laktoosi, sakkaroosi, trehaloosi, melitsitoosi, gentiobioosi, D-turanoosi ja D-tagatoosi. LC705 adheroituu mukus-soluihin huonosti, mutta sen sijaan adheroituu kohtalaisesti epiteelisoluihin. Kannan elinkyky alhaisissa pH-arvoissa sekä korkeissa sappihappopitoisuuksissa on hyvä. Kanta kestää hyvin 5 %:n suolapitoisuuksia ja kohtalaisesti 10 %:n suolapitoisuuksia. *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* LC705 on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) talletusnumerolla DSM 7061.

Lactobacillus rhannosus LC 705 käytetään mm. emmentaljuustojen valmistuksessa estämään klostridien aiheuttamaa voi-happokäymistä. Kanta käytetään myös elintarvikkeissa, joissa sen funktio on hiivojen ja homeiden kasvun esto. Biosäilönnässä LC705 -kanta yhdistetään *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS:n kanssa (FI 92498).

Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii* JS (PJS) on myös kuvattu tarkemmin FI-patentissa 92498, Valio Oy. PJS on gram-positiivinen, lyhyt sauva, se fermentoi glukoosia, fruktoosia, galaktoosia ja laktoosia, fermentoi hyvin laktaattia, ja sen optimikasvulämpötila on 32 °C. Kannan elinkyky alhaisissa pH-arvoissa sekä korkeissa sappihappopitoisuuksissa on erinomainen. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on talletettu talletuslaitokseen Deut-

sche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH talletusnumerolla DSM 7067.

Keksinnön mukaisesti käytettävien mikrobien lisäksi valmistettaviin tuotteisiin voi sisältyä muitakin mikro-organismeja, kuten esimerkiksi meijeri-
 5 teollisuudessa käytettyihin hapatteisiin sisältyviä mikro-organismeja ja probiootteja. Lukuisia kantoja on hyvin dokumentoitu ja kaupallisesti saatavilla esimerkiksi hapatevalmistajilta Hansen A/S, Tanska, ja Danisco/Wiesby GmbH, Saksa.

Keksinnön mukaista käyttöä varten mikro-organismeja kasvatetaan
 10 alalla tavanomaisia menetelmiä noudattaen. Mikro-organismeja voidaan kasvattaa puhtasviljelminä tai erilaisina sekaviljelminä. Viljelmiä voidaan käyttää sellaisenaan tai käsitellä halutulla tavalla, esimerkiksi puhdistaa, konsentroida, lyofilisoida tai viimeistellä erilaisiksi valmisteiksi. Keksinnön mukaisesti käytettävien mikro-organismien valmistus on kuvattu yksityiskohtaisesti mm. jul-
 15 kaisuissa FI 92498 ja FI 20010157.

Keksinnön mukaisesti probiootteja käytetään riittävä määrä halutun hiivanestovaikutuksen aikaansaamiseksi. Kunkin probiootin määrä voi siten vaihdella laajalla alueella riippuen mm. probioottien yhteisestä solumäärästä, päivän kokonaisannoksesta ja tuotteen muista ominaisuuksista ja aineosista. Yleensä
 20 yhdistelmä sisältää probiootteja noin 10^6 - 10^{10} pmy päivittäisessä annoksessa.

Keksinnön mukaisesti probiootit soveltuvat käytettäväksi sellaisenaan tai formuloituina esimerkiksi kapselin, pillerin tai tabletin muotoon farmaseuttisten valmisteiden tavanomaisia valmistustapoja noudattaen. Keksinnön mukaisesti
 25 käytettävät probiootit voidaan myös lisätä erilaisiin nautittavaksi tarkoitettuihin tuotteisiin, kuten elintarvikkeisiin, juoma- tai makeisteollisuuden tuotteisiin, terveysvaikutteisiin tuotteisiin, luontaistuotteisiin jne. Edullisina käyttömuotoina pidetään esillä olevan keksinnön puitteissa mainittuja probiootteja sisältävät meijeriteollisuuden tuotteet, erityisesti juustot ja levitteet, jogurtit ja muut hapatetut maitotuotteet sekä lastenruuat, mehut ja keitot, sekä kapselit, pillerit ja
 30 tabletit.

Lopputuotteet valmistetaan tavanomaisia menettelytapoja käyttäen, lisäten probiootteja joko muun valmistuksen yhteydessä tai sen jälkeen, lopputuotteen viimeistelyn yhteydessä.

Julkaisussa tarkemmin kuvatuissa kokeissa on tutkittu keksinnön mu-
 35 kaisesti käytettävien probioottien vaikutusta suun hiivojen estoon. Näistä hiivoista

yleisin on *Candida albicans*, joka laajalti elimistössä esiintyvänä ja edustavana hiivalajina on erittäin käyttökelpoinen myös suussa esiintyvien muiden hiivalajien samoin kuin muualla elimistössä esiintyvien muiden hiivalajien malliorganismina. Esimerkeissä esitetyt tulokset osoittavat, että keksinnön mukaisesti käytettävillä

5 probiooteilla on tilastollisesti merkitsevä vähentävä vaikutus suun hiivojen määrään. Alustavien tulosten perusteella on ilmeistä, että keksintö soveltuu laajalti estämään, vähentämään tai hidastamaan myös muualla elimistössä, kuten suolistossa ja urogenitaali-alueella esiintyvien hiivojen kasvua ja toimintaa.

Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisesti seuraavien esimerkkien avulla.

10 Nämä esimerkit annetaan vain keksinnön valaisemiseksi eikä niitä pidä katsoa sen suojapiiriä mitenkään rajoittaviksi.

Esimerkki 1

Probioottien vaikutus hiivan *Candida albicans* esiintyvyyteen

15 Tutkimuksen päätavoitteena oli selvittää voidaanko probioottiyhdistelmällä, joka sisältää laktobasilleja ja propionihappobakteereja, vähentää hiivan *Candida albicansin* esiintyvyyttä suussa. Koemateriaaliksi otettiin Emmental-tyyppinen juusto, joka sisälsi eläviä *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103-, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061-, ja *Propionibacterium*

20 *freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067 -mikrobjea. Juusto valittiin, koska se on normaaliin ruokavalioon kuuluva tuote, jota on mieluista syödä ja helppo annostella tutkimuksen tarkoitusten mukaisesti. Vertailujuusto oli Edam-juusto, joka ei sisältänyt kyseisiä kolmea bakteerikantaa, mutta sen sijaan sisälsi normaalit hapatemikrobit, jotka ovat laktokokkeja.

25 Tutkimukseen rekrytoitiin 240 henkilöä, joiden ikä vaihteli 70:stä saatan vuoteen.

Tutkimus toteutettiin lumekontrolloituna kaksoissokkokeena, jossa oli rinnakkaiset tutkimusryhmät. Tutkimus kesti kaikkiaan 19 viikkoa, jakautuen 3 viikon run-in jaksoon sekä 16 viikon interventioon. Koko tutkimuksen aikana

30 probioottisia bakteereja sisältävien elintarvikkeiden käyttö oli kiellettyä. Kiellettyjen elintarvikkeiden listalla olivat mm. Emmental- ja Polar-juustot, maitorahka, sekä eläviä maitohappobakteereja sisältävät hapanmaitotuotteet, probioottimehut ja erilaiset kapselit ja puristeet.

Koehenkilöt noudattivat tavanomaisia suuhygieniatottumuksia ja

35 elintapojaan koko tutkimuksen ajan.

Interventio: Juustointerventio kesti 16 viikkoa (vk). Tänä aikana puolet koehenkilöistä nautti päivittäin 50 g (= 6 - 7 viipaletta) probioottibakteereita sisältävää juustoa, puolet saman verran kontrollijuustoa. Juustot nautittiin kuumentamattomina aamuin illoin ruokailun, lääkkeiden nauttimisen ja hampaiden pesun jälkeen. Probioottijuusto sisälsi *L. rhamnosus* LGG:tä 10^7 cfu/g, *L. rhamnosus* LC705:tä 10^7 cfu/g ja *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS:ää 10^7 cfu/g. Näiden kokonaisbakteerimääräksi tuli siis 10^9 - 10^{10} cfu/pv.

Suun kliiniset tarkastukset: Suun tarkastukset ja sylkinäytteiden otto suoritettiin tutkittavien luona palvelutaloissa/vanhainkodeissa. Kliinisessä tarkastuksessa rekisteröitiin paikatut, poistetut ja karioituneet hampaat (DMF). Myös parodontiumin kunto tarkastettiin ja luokiteltiin CPI-indeksillä. Mahdolliset suun limakalvojen muutokset rekisteröitiin (mm. infektiot, värjäymät, haavaumat, lichenoidit leesiot ja haavaumat, hyperplasiat, leukoplakia, erytroplakia ja muut). Kliiniset tarkastukset tehtiin tutkimuksen alussa (0 vk) ja lopussa (16 vk).

Sylkinäytteet: Sylkinäytteet hiivojen, syljeneritysnopeuden ja puskurikapasiteetin määrittämiseksi otettiin aamuisin klo 8 - 11 välisenä aikana. Näytteenotto pyrittiin suorittamaan samalla ihmisellä aina samaan aikaan. Tutkittavien oli oltava syömättä ja pesemättä hampaitaan 1 tunti ennen näytteenottoa. Sylkinäytteet hiivan määrittämistä varten otettiin tutkimuksen alussa (0 vk), puolivälissä (8 vk) ja lopussa (16 vk). Syljen eritysnopeus ja puskurikapasiteetti määritettiin alku- (0 vk) ja loppunäytteistä (16 vk).

Hiivojen määrittämiseksi syljestä otettiin suun limakalvolta pumpulitikkunäyte. Hiivojen (lähinnä *Candida albicans*) toteamiseen käytettiin Dentocult CA viljelymenetelmää, jossa putkia inkuboidaan lämpökaapissa 37°C 2 vuorokautta ja kasvu määritellään sen jälkeen semikvantitatiivisesti asteikolla 0-3 (0 = ei pesäkkeitä, 1 = 1 - 20 pmy/liuska, 2 = 21 - 50 pmy, 3 > 50 pmy).

Syljen eritysnopeuden määrittämiseksi mitattiin sekä leposylki että stimuloitu sylki. Hyposalivaation raja-arvona leposyljelle pidetään 0,1 ml/min, joten leposylkeä kerättiin 15 min (1,5 ml / 15 min). Stimuloitua sylkeä kerättiin 5 minuuttia (hyposalivaation raja-arvo 3,5 ml / 5 min).

Syljen puskurointikyky on yhteydessä eritysnopeuteen. Tästä syystä puskurikapasiteetti mitattiin Dentobuff-testillä. Testi tehtiin stimuloidusta syljestä, koska leposyljen puskurointikyky on aina heikko.

Hiivan määrä interventiojakson päättyessä oli tutkimuksen primaari vastemuuttuja. Ryhmien välistä eroa hiivan esiintyvyyden ja määrän suhteen testattiin chi-neliötestillä. Lisäksi huomioitiin hiivan esiintyvyys tai määrä baseline-tilanteessa ja mahdolliset demografiset tekijät (kuten ikä, sukupuoli, proteesit) käyttämällä logistista regressioanalyysiä. Myös syljen erityisnopeus ja puskurikapasiteetti huomioitiin tällöin tarvittaessa selittävinä tekijöinä. Vastavalla tavalla analysoitiin korkean pitoisuuden esiintyvyys. Syljen erityisnopeudessa ja puskurikapasiteetissa tapahtuneet muutokset kuvailtiin.

Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa, joissa A on probioottijuustoa syöneiden ryhmä, B kontrolliryhmä. Pesäkemäärä on esitetty seuraavasti:

- 0 = ei pesäkkeitä
- 1 = 1 - 20 pmy/liuska
- 2 = 20 - 50 pmy/liuska
- 3 = yli 50 pmy/liuska

15

Taulukossa 1 esitetään tutkimuksen alussa sekä 8 ja 16 viikon intervention jälkeen mitatut tarkat hiivatulokset niiltä henkilöiltä, joilta on kaikki kolme mittauskertaa (ryhmässä A $n = 92$, ryhmässä B $n = 100$). Taulukossa 2 esitetään luokitellut hiivamäärät tutkimuksen alussa sekä 8 ja 16 viikon intervention jälkeen niiltä henkilöiltä, joilta on kaikki kolme mittauskertaa (ryhmässä A $n = 92$, ryhmässä B $n = 100$).

20

Taulukko 1

Tarkat hiivatulokset tutkimuksen alussa ja 8 viikon ja 16 viikon intervention jälkeen

		A		B	
		n	%	n	%
Baseline	0	27	29,3	30	30,0
	1	37	40,2	42	42,0
	2	17	18,5	14	14,0
	3	11	12,0	14	14,0
8 vko	0	32	34,8	37	37,0
	1	37	40,2	32	32,0
	2	10	10,9	15	15,0
	3	13	14,1	16	16,0
16 vko	0	35	38,0	33	33,0
	1	38	41,3	33	33,0
	2	11	12,0	17	17,0
	3	8	8,7	17	17,0

Taulukko 2

Luokitellut hiivapiltoisuudet tutkimuksen alussa ja 8 ja 16 viikon intervention jälkeen

0 vs. 1-4

		A		B	
		n	%	n	%
Baseline	0	27	29,3	30	30,0
	1-4	65	70,7	70	70,0
8 vko	0	32	34,8	37	37,0
	1-4	60	65,2	63	63,0
16 vko	0	35	38,0	33	33,0
	1-4	57	62,0	67	67,0

0-1 vs. 2-4

		A		B	
		n	%	n	%
Baseline	0-1	64	69,6	72	72,0
	2-4	28	30,4	28	28,0
8 vko	0-1	69	75,0	69	69,0
	2-4	23	25,0	31	31,0
16 vko	0-1	73	79,3	66	66,0
	2-4	19	20,7	34	34,0

0-2 vs. 3-4

		A		B	
		n	%	n	%
Baseline	0-2	81	88,0	86	86,0
	3-4	11	12,0	14	14,0
8 vko	0-2	79	85,9	84	84,0
	3-4	13	14,1	16	16,0
16 vko	0-2	84	91,3	83	83,0
	3-4	8	8,7	17	17,0

Ryhmät A ja B verrattiin toisiinsa hiivan esiintymisen suhteen 8 ja 16 viikon intervention jälkeen sekä suoraan että ottamalla mahdolliset sekoittavat tekijät huomioon. Näitä ovat ikä, sukupuoli, asumismuoto, diagnoosien lukumäärä, lääkkeiden lukumäärä, BMI, syljen virtausnopeus, puskurikapasiteetti ja mahdollinen proteesi. Sekoittavien tekijöiden huomioon ottaminen tapahtui käyttäen menetelmänä askeltavaa logistista regressiota. Ryhmä ja hiivan baseline-tilanne pakotetaan malliin (block 1) ja listan sekoittavat tekijät huomioidaan askeltaen (block 2; sisäänottokriteerinä p alle 0,15). Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa, joissa taulukossa 3 esitetään suora vertailu kohtalaisen korkean hiivan esiintymisen ryhmässä, eli luokat 2 - 4, taulukossa 4 sekoittavat tekijät huomioidaan, taulukossa 5 esitetään suora vertailu korkean hiivan esiintymisen ryhmässä, eli luokat 3 - 4, ja taulukossa 6 sekoittavat tekijät huomioidaan. Näissä taulukoissa lyhenne OR = odds ratio = suhteellinen riski, riskisuhde, ja lyhenne CI for OR = confidence interval odds ratio = (riskisuhteen) luottamusväli.

Taulukko 3**Kohtalaisen korkean (luokat 2-4) hiivan esiintyminen****a) 8 viikon jälkeen**

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	-0,469	0,178	0,625	0,316 to 1,239
Hiiva alussa 2-4	2,382	<0,0001	10,825	5,450 to 21,500
Vakio	-1,520	<0,0001		

b) 16 viikon jälkeen

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	-0,946	0,014	0,388	0,182 to 0,826
Hiiva alussa 2-4	2,244	<0,0001	9,4355	4,461 to 19,957
Vakio	-1,390	<0,0001		

Taulukko 4
Kohtalaisen korkean (luokat 2-4) hiivan esiintyminen sekoittavat tekijät huomioiden

		B	p-arvo	OR	95% CI for OR
Step 1	Ryhmä A	-1,229	0,0082	0,293	0,118 to 0,728
	Hiiva alussa 2-4	1,911	<0,0001	6,757	2,875 to 15,884
	Puskurikapasiteetti		0,0002		
	Puskurikapasiteetti (H)	-2,318	<0,0001	0,098	0,032 to 0,299
	Puskurikapasiteetti (M)	-1,614	0,0113	0,199	0,057 to 0,694
	Constant	0,481	0,3896	1,617	
Step 2	Ryhmä A	-1,378	0,0043	0,252	0,098 to 0,649
	Hiiva alussa 2-4	1,845	<0,0001	6,325	2,636 to 15,178
	Puskurikapasiteetti		0,0003		
	Puskurikapasiteetti (H)	-2,388	<0,0001	0,092	0,029 to 0,290
	Puskurikapasiteetti (M)	-1,588	0,0152	0,204	0,057 to 0,737
	Proteesi (status 1)	1,117	0,0390	3,057	1,058 to 8,831
	Constant	-0,246	0,7165	0,782	

Taulukko 5

Korkean (luokat 3-4) hiivan esiintyminen

a) 8 viikon jälkeen

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	0,029	0,956	1,029	0,373 to 2,837
Hiiva alussa 3-4	4,022	<0,0001	55,8	18,7 to 166,8
Vakio	-2,782	<0,0001		

b) 16 viikon jälkeen

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	-0,824	0,098	0,439	0,165 to 1,164
Hiiva alussa 3-4	2,420	<0,0001	11,244	4,186 to 30,208
Vakio	-2,142	<0,0001		

Taulukko 6

**Korkean (luokat 3-4) hiivan esiintyminen sekoittavat tekijät
huomioiden**

		B	p-arvo	OR	95% CI for OR
Step 1	Ryhmä A	-1,067	0,0657	0,344	0,110 to 1,072
	Hiiva alussa 3-4	2,221	0,0003	9,216	2,798 to 30,359
	Puskurikapasiteetti		0,0370		
	Puskurikapasiteetti (H)	-1,629	0,0142	0,196	0,053 to 0,721
	Puskurikapasiteetti (M)	-0,551	0,4525	0,576	0,137 to 2,428
	Vakio	0,982	0,1136	0,375	
Step 2	Ryhmä A	-1,213	0,0437	0,297	0,091 to 0,966
	Hiiva alussa 3-4	2,300	0,0002	9,974	2,979 to 33,396
	Puskurikapasiteetti		0,0238		
	Puskurikapasiteetti (H)	-1,807	0,0080	0,164	0,043 to 0,624
	Puskurikapasiteetti (M)	-0,726	0,3339	0,484	0,111 to 2,109
	Naissukupolvi	-0,956	0,0991	0,385	0,124 to 1,197
Step 3	Vakio	-0,154	0,8452	0,857	
	Ryhmä A	-1,475	0,0222	0,229	0,065 to 0,810
	Hiiva alussa 3-4	2,213	0,0004	9,145	2,704 to 30,924
	Puskurikapasiteetti		0,0256		
	Puskurikapasiteetti (H)	-1,846	0,0086	0,158	0,040 to 0,625
	Puskurikapasiteetti (M)	-0,781	0,3151	0,458	0,100 to 2,101
	Naissukupolvi	-1,371	0,0305	0,254	0,073 to 0,879
	Proteesi (status 1)	1,274	0,1003	3,576	0,782 to 16,350
	Vakio	-0,713	0,4344	0,490	

Tulokset osoittavat, että ikääntyminen, proteesien käyttö sekä syljen erityisnopeuden väheneminen olivat selkeästi yhteydessä lisääntyneeseen hiivamäärään. Lähtötilan hiivojen määrä oli puolestaan vähäisempi, mikäli tutkittava ilmoitti ennen tutkimuksen aloittamista käyttäneensä maitohappobakteereita sisältäviä tuotteita säännöllisesti.

Tarkasteltaessa pelkkiä hiivatuloksia, ilman että sekoittavia tekijöitä otetaan huomioon, nähdään, että probioottiryhmässä hiivamäärän lasku oli runsaampaa kuin kontrolliryhmässä. Riippumatta siitä tarkastellaanko hiivan esiintyvyyttä (1-4), kohtalaisen hiivan esiintyvyyttä (2-4), tai korkeiden hiivojen esiintyvyyttä (3-4) huomataan, että probioottiryhmäläisten osuus pienenee näissä ryhmissä intervention edetessä. Kontrolliryhmäläisten osuudet näissä ryhmissä eivät puolestaan muutu näin selkeästi. Korkeamman hiivamäärän ryhmissä tutkittavien osuus näyttää kontrolliryhmässä jopa kasvavan.

Kun sekoittavia tekijöitä huomioidaan, havaitaan probiootti-intervention pienentävän tilastollisesti merkitsevästi sekä kohtalaisen korkean (2-4) että korkean (3-4) hiivamäärän esiintyvyyttä kontrolliryhmään verrattuna.

Tulokset osoittavat siten, että käyttämällä juustoa, joka sisälsi edellä mainitut probiootit, saatiin aikaan merkitsevä pieneneminen hiivojen määrään. Esillä oleva keksintö on siten käyttökelpoinen hiivojen estoon keksinnön tavoitteiden mukaisesti.

Patenttivaatimukset

1. Mikrobien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttö valmistettaessa hiivan estoon tarkoitettua tuotetta.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että valmistetaan elintarviketeollisuuden tai lääketeollisuuden tuotetta, terveysvaikutteista tuotetta tai luontaistuotteita.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että valmistetaan elintarviketuotetta.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että valmistetaan maitotuotetta, edullisesti juustoa.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että valmistuksessa käytetään lisäksi muita, tavanomaisia (hapate)bakteereita.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että muodostetaan mikrobeja sisältävä yksikköannosmuoto.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että annosmuoto on suun kautta nautittava valmiste.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen mikrobien käyttö, tunnettu siitä, että annosmuoto on kapseli tai tabletti, joka mikrobien lisäksi sisältää ksyliolia.
9. Menetelmä hiivojen kasvun estämiseksi ja hiivojen aiheuttamien oireiden lievittämiseksi eläimessä tai ihmisessä, joka menetelmä käsittää mikrobien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7061, antamisen niitä tarvitsevalle yksilölle riittävä määrä halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi.

(57) Tiivistelmä

Keksintö liittyy mikrobien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttöön hiivan kasvun estämiseksi, hiivan aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi ja hoitamiseksi, ja hiivan aiheuttamien oireiden lievittämiseksi eläimessä tai ihmisessä.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser användning av mikroberna *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061 och *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* PJS, DSM 7067 för att förhindra tillväxt av jäst, för att förebygga och behandla sjukdomar förorsakade av jäst och för att lindra symptom förorsakade av jäst i djur eller människa.